



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①2 Offenlegungsschrift
①0 DE 196 16 216 A 1

⑤1 Int. Cl.⁸:
G 01 N 1/28
C 12 Q 1/00
G 02 B 21/34
B 23 K 26/00
// C 12 Q 1/68

②1 Aktenzeichen: 196 16 216.5
②2 Anmeldetag: 23. 4. 96
④3 Offenlegungstag: 30. 10. 97

DE 196 16 216 A 1

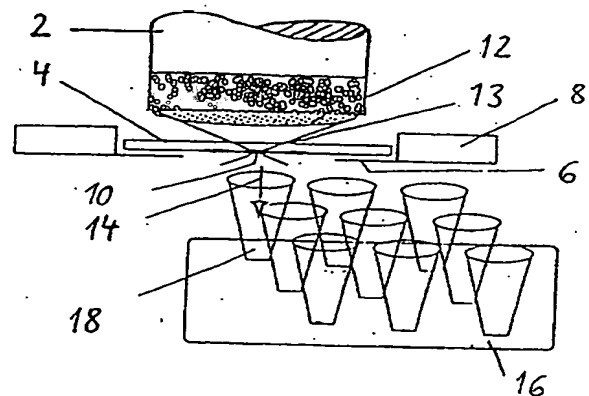
⑦1 Anmelder:
P.A.L.M. GmbH, 82515 Wolfratshausen, DE
⑦4 Vertreter:
H. Ruschke und Kollegen, 81679 München

⑦2 Erfinder:
Schütze, Karin, Dr., 82515 Wolfratshausen, DE;
Schütze, Raimund, 82515 Wolfratshausen, DE

⑤4 Verfahren und Vorrichtung zur Gewinnung von laserdisezierten Partikeln wie biologische Zellen bzw. Zellorganellen, Chromosomenteilchen etc.

⑤7 Verfahren und Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens zum Separieren und Sortieren von biologischen Objekten, mit

- einer Mikroskopanordnung (2) zur Beobachtung von biologischen Objekten wie Gewebeschnitten auf einem Objektträger (4),
- einer Laseranordnung zur Erzeugung eines fokussierten Laserstrahls (13) zum Freipräparieren eines oder mehrerer selektierter biologischer Objekte (10) auf dem Objektträger (4), wobei Laseranordnung und Objektträger relativ zueinander verschieblich angeordnet sind,
- und einer Auffangvorrichtung (18 bzw. 20) in Richtung des Laserstrahls hinter dem Objektträger (4) zum Auffangen der selektierten Objekte (10), die nach dem Freipräparieren derselben durch einen Laser-induzierten Transportprozeß (einen "Laser-Schuß") vom Objektträger (4) auf die Auffangvorrichtung (18 bzw. 20) wegkatapultiert werden (Flugbahn 14).



DE 196 16 216 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 09. 97 702 044/74

6/25

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Sortieren und Separieren für einzelne biologische Objekte. Die Objekte sind hierbei auf einem festen planaren Träger nebeneinander angeordnet. Mit diesem Verfahren können aus einer sehr großen Zahl von Objekten (z. B. $10^5 - 10^9$) einzelne Objekte räumlich abgetrennt und ausgesondert werden. Die Abtrennung von gehäuftten Zellen als Gesamteinheit ist ebenso möglich. Ebenso kann das Verfahren zur Separation von spezifischen Zellen aus Gewebeschnitten eingesetzt werden. Voraussetzung für dieses Sortierverfahren ist die vorherige Erkennung und Selektion der betreffenden Objekte aufgrund spezifischer Eigenschaften (z. B. durch Färbung, Fluoreszenzmarkierung oder durch radioaktive Markierung). Unter "biologischen Objekten" werden im Rahmen der vorliegenden Anmeldung vor allem lebende oder fixierte biologische Zellen oder Zellbestandteile verstanden.

Zur Separation einzelner biologischer Objekte lassen sich Objekte mit optischen Methoden, wie der optischen Pinzette (Optical Tweezer) in einer wäßrigen Lösung bewegen (K. Schütze, A. Clement-Sengewald, Nature, 667 (Vol. 368) 1994). Aufgrund der geringen Kraftübertragung ist diese Methode auf Objekte beschränkt, die sich frei in der Lösung bewegen können. Da sich die sortierten, wie die unsortierten Objekte in der gleichen Lösung befinden, ist eine getrennte Kultivierung nur mit zusätzlichem Aufwand erzielbar. Für eine getrennte Kultivierung müssen diese Zellen mit einer anderen Methode, wie z. B. mit Mikrokapillaren abgetrennt bzw. abgesaugt werden. Adhärenz wachsende Zellen können mit feinen Nadeln, die über Mikromanipulatoren bewegt werden, separiert werden. Hierbei werden die Zellen direkt berührt und könnten somit mechanisch belastet werden. Beide Methoden sind verhältnismäßig zeitintensiv, so daß sie nicht zur Bearbeitung einer Vielzahl von Objekten geeignet sind.

Zur Separierung einzelner Zellen aus einer großen Zahl ($> 10^6$) in einer Flüssigkeit dispergierter, biologischer Objekte geeignete Trenn- bzw. Sortierapparate sind kommerziell erhältlich. Während bei der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS = Fluorescence activated Cell Sorter) elektrostatische Prinzipien zur räumlichen Separation zum Einsatz kommen, arbeitet der magnetisch aktivierte Zellsortierer (MACS = Magnetic activated Cell Sorter) mit magnetischen Kräften. Hierbei liegen die Zellen jedoch nicht auf einem planaren Träger nebeneinander. Überdies haben beide Methoden den Nachteil, daß sich manche Objekte nur eingeschränkt (FACS) oder überhaupt nicht getrennt voneinander absondern lassen (MACS).

Die vorgestellten Methoden können keine Zellen aus einem Zellverband wie etwa einem Gewebe oder aus histologischen Gewebepreparaten lösen.

Ferner sind unter dem Namen "Ablative Photodecomposition" Verfahren bekannt, bei denen mit gepulsten UV-Lasern, insbesondere mit Excimer-Lasern, ein gezielter Materialabtrag bei Polymeren erfolgt. Diese Verfahren können im weitesten Sinne als Ätzverfahren angesehen werden. Ein ähnliches Verfahren, bei dem jedoch ein kontinuierlich betriebener UV-Laser verwendet wird, wird in dem US-Patent 5 211 805 beschrieben. Dieses Verfahren soll sich zur industriellen Bearbeitung von technischen Polymeren und zur biomedizinischen Behandlung von biologischem Gewebe eignen. Hiermit ist ein Sortierprinzip verwandt, das mit Laser-

strahlen die auf einem Träger befindlichen unerwünschten biologischen Objekte mit hohen Strahlungsdosen zerstört, während die selektierten (erwünschten) Objekte zurück bleiben (US 4 624 915). Dieser Prozeß ist verhältnismäßig aufwendig, um einzelne Objekte aus großen Populationen zu selektieren.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht in der räumlichen Separation einzelner biologischer Objekte, die nebeneinander auf einem festen planaren Träger wie z. B. einem Objektträger aus Glas ausgebracht sind. Hierbei soll der Vorgang des Absonderns möglichst kurz (< 10 s) und berührungslos, z. B. in abgetrennten, sterilen Kammern durchführbar, sein. Außerdem soll der Prozeß sehr zuverlässig und damit in einfacher Weise automatisierbar sein. Gleichzeitig soll die Überlebensfähigkeit der biologischen Objekte in der Regel gewährleistet bleiben; d. h. die biologischen Objekte sollen durch den Abtrennprozeß nicht geschädigt bzw. beeinträchtigt werden.

In der Patentanmeldung 196 03 996.7 vom 05.02.1996 wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß ein Bereich einer Trägerfolie, auf dem sich das selektierte biologische Objekt befindet, mit einem Laserstrahl ausgeschnitten und durch einen laser-induzierten Transportprozeß auf ein unmittelbar oberhalb oder unterhalb der Trägerfolie angeordnetes Auffängersubstrat übertragen wird. Die Lösung nach diesem früheren Vorschlag besteht also darin, daß die biologischen Objekte in einem kleinen, vorzugsweise kreisförmigen Umfeld mitsamt der Trägerfolie von einem Laserstrahl ausgeschnitten und zusammen mit dem ausgeschnittenen Teil der Trägerfolie auf einen in der Nähe angebrachten Auffänger geschleudert werden. Dies geschieht offenbar aufgrund des Lichtdrucks des Laserstrahls, da die herausgetrennten Teile der Trägerfolie mitsamt dem biologischen Objekt darauf stets in Richtung des Laserstrahls beschleunigt werden.

Zur weiteren Verbesserung des Verfahrens nach vorgenannter Patentanmeldung 196 03 996.7 wird vorliegend eine neue und verbesserte Lösung der der Erfindung zugrundeliegenden Aufgabe dadurch vorgesehen, daß der Lichtdruck des Laserstrahls nun dafür verwendet werden soll, das gewünschte Partikel bzw. biologische Objekt selbst unmittelbar von der Oberfläche des festen planaren Trägers (Objektträger oder Petrischale) wegzukatapultieren und in einem geeigneten Gefäß aufzufangen, d. h. die Separierung eines biologischen Objektes ist auch ohne gleichzeitiges Herauslösen bzw. Herausschneiden des das biologische Objekt tragenden Bereiches der Trägerfolie möglich. Dies geschieht nach der vorliegenden Neuerung bzw. Verbesserung in der folgenden Weise, die anhand der beiliegenden Fig. 1 bis 3 erläutert werden soll:

Bei Verwendung eines aufrechten Mikroskopes 2 gemäß Fig. 1 wird ein geeigneter Objektträger 4 (Dicke circa $170 \mu\text{m}$) umgekehrt auf die Aufnahmehalterung 6 eines speziell für die Lasermikromanipulation entwickelten Mikroskoptisches 8 gelegt, d. h. das biologische Objekt 10 befindet sich auf der Unterseite des Objektträgers 4. Bei dem Objekt handelt es sich z. B. um histologische Gewebeschnitte von wenigen μm Dicke, oder um adherierende Chromosomen- bzw. DNA-Präparate.

Der Mikroskoptisch 8 ist für eine Verschiebung in 2 (für x/y Bewegung) oder 3 Achsen (für x/y/z Bewegung) ausgelegt und mit einer Aufnahmevorrichtung 6 für z. B. Objektträger 4 oder Petrischälchen versehen. Der Tisch 8 ist also über geeignete Antriebe motorisiert, die computergesteuert in bekannter Weise z. B. über eine Com-

putermaus (oder Joystick) bewegt werden können. Die hybriden Schrittmotoren der Achsen-Antriebe arbeiten mit einer hohen Präzision. Der kleinste Schritt beträgt 20 nm, der maximale Verfahrweg des Mikroskoptisches 8 kann bis zu mehreren Zentimetern (z. B. 10 cm) betragen. Die Präzision zum Wiederauffinden gespeicherter Punkte ist < 400 nm. Es können Geschwindigkeiten zum Verfahren des Mikroskoptisches von nahezu Null bis zu 25 mm/Sekunde gewählt werden. Mit einem sog. Framgrabber wird das über eine Videokamera aufgezeichnete, aktuelle Mikroskopbild auf einen Monitor gegeben und kann mit Computerfunktionen, z. B. Befehlsfunktionen, Steuerzeichen, Kontrollmarken etc., graphisch überlagert werden (Video-Overlay).

Für Lasermikromanipulation geeignet sind nur dünne Objektträger (ca. 170 µm dick) oder Petrischalen mit dünner (ca. 25 µm), gasdurchlässiger Folie (sog. Petriperm-Schälchen). Da für die Lasermikromanipulation im Nanometer-Bereich hohe Anforderungen an eine präzise Probenhalterung und Probenführung gestellt werden, wurde die Aufnahmehalterung 6 speziell konfiguriert: Bei den dünnen Objektträgern 4 besteht die Gefahr, daß sie sich z. B. bei Verwendung von Öl-Immersions-Objektiven leicht durchbiegen und somit keine gute Fokussierung erreicht werden kann. Um dies zu vermeiden, muß der Objektträger 4 an mindestens 3 Seiten der Halterungen aufliegen, wobei nur die beiden schmalen Seiten des Objektträgers 4 mit je einer Federklammer festgeklammert werden können. Eine weitere Notwendigkeit, speziell für die Lasermikroskopie, ist die exakte Justierbarkeit des Probenhalters (Objektträger 4 oder Aufnahmehalterung 6). Es muß gewährleistet sein, daß die Probe immer im gleichen Abstand zur Spitze des Objektivs 12 liegt, und zwar im gesamten Verfahrbereich des Trägers (circa 5–10 cm).

Zuerst werden geeignete biologische Objekte 10 mit einer kleineren Vergrößerung lichtoptisch ausgewählt. Sobald alle interessanten Objekte im Computer gespeichert sind, wechselt man zu einem höhervergrößernden Objektiv. Den durch den Objektivwechsel bedingten Strahlversatz (chromatische Abberation) gleicht man durch eine Korrekturfunktion an einem gespeicherten Wert aus, die dann automatisch auf alle gespeicherten Punkte übertragen wird.

Der Computer verfährt nun zu dem ersten Objekt 10. Das von einer Videokamera aufgezeichnete Mikroskopbild wird auf dem in den Figuren nicht gezeigten Computermonitor dargestellt. Ein Marker auf dem Monitor zeigt die Position des Laserstrahlfokusses an. Die Mikroskopbühne wird entweder per Hand (über Maus oder Joystick kontrolliert) bewegt oder fährt automatisch durch ein Computerprogramm gesteuert nach vorgegebenem Muster im wesentlichen kreis- oder spiralförmig um das gewählte Objekt 10 herum. Der "Marker" auf dem Monitor kann als "Stift" betrachtet werden, mit dem die Kontur des gewünschten biologischen Objektes nachgezeichnet wird. Wenn gleichzeitig der Laser mit einer Pulsfrequenz von circa 15–20 Hz feuert, wird alles Material, das sich in der Schußlinie im Bereich des "Marker" befindet, abgetragen bzw. zerstört. Der extrem fokussierte Laserstrahl "zeichnet" eine feine Linie von circa 500 nm Breite rund um das gewünschte Objekt 10 und trennt es somit von seiner Umgebung. Bei Zellen im histologischen Schnitt löst sich durch diese Prozedur die gewünschte Zelle vom Zellverband und lockert sich vom Untergrund in Gestalt des Objektträgers 4. Durch das oben erwähnte spiralförmige Umrunden der ausgewählten Zielzelle wird der freigelaserte

Bereich rund um die Zelle vergrößert.

Bei dem hier verwendeten Laser handelt es sich um einen gepulsten, kompakten Stickstofflaser von hoher Strahlqualität (Wellenlänge: 337 nm, Pulsdauer: 3 nsec (Nanosekunden), Pulsfrequenz: von 10 bis 20 Hertz). Andere Laser sind auch denkbar, sofern die verwendete Laserwellenlänge das biologische Material nicht negativ beeinflusst. Der Laserstrahl selbst bzw. seine Quelle bleibt vorzugsweise unbeweglich. Allerdings kann der Laser auch in x/y Richtung mit einem Radius von circa 100 µm relativ zur Objektebene bewegt werden, d. h. letztendlich ist nur wichtig, daß Laserstrahl und Objektebene (Mikroskoptisch) relativ zueinander bewegt werden.

Das auf diese Weise freipräparierte Objekt kann nun schneller und sicherer, als im Stand der Technik (etwa mit einer Nadel) und vor allem berührungsfrei, d. h. wenn nötig auch völlig steril, mit einem weiteren, gezielten Laserschuß automatisch in ein Probengefäß hinein katapultiert werden (Flugbahn 14).

Dazu ist es notwendig, daß eine zweite Aufnahmehalterung 16 (z. B. um ein Auffanggefäß 18 oder eine Mikrotiterplatte einzuspannen) über zwei motorisierte und computergesteuerte Achsen so unter die erste Aufnahmehalterung 6 verfahren wird, daß das per Laser freipräparierte Objekt 10 genau über dem Auffanggefäß 18 plaziert wird. Hier ist ebenfalls eine hohe Präzision der Motorbewegung Voraussetzung für ein sauberes Aufheben der gewünschten Objekte. Ein einzelner, gezielter Laserschuß (eventuell leicht defokussiert) schleudert das selektierte biologische Objekt 10 bzw. die Zelle in Strahlrichtung (Flugbahn 14) ins Auffanggefäß 18. Danach kann ein neues Objekt ausgeschnitten werden und der ganze Vorgang wiederholt sich.

Zur Beschleunigung des Sammelvorgangs können alle gewünschten Objekte zuerst mit dem Laser freipräpariert werden. Danach wird das Auffanggefäß 18 unter den Mikroskoptisch gefahren. Die Mikroskopbühne fährt nacheinander die gespeicherten, lasermikrodissektierten Objekte wieder an. Je ein Schuß befördert die einzelnen Objekte nacheinander in jeweils frische (neue) Auffanggefäße 18, Fig. 1, die koordiniert mit der Bewegung der Mikroskopbühne 8 weitertransportiert werden.

Bei einem inversen Mikroskop (Fig. 2) kann ein klebendes Scheibchen (Klebefolie, Agar-bestricherer Träger etc.), das wenige µm direkt über das ausgeschnittene Objekt geführt wird, zum Auffangen des wegkatapultierten Objektes verwendet werden. Diese Klebeklatte 20 wird dann vom Robotarm 22 in ein geeignetes Gefäß (Fig. 3) geworfen, und der Robotarm 22 sucht sich ein neues Klebeteilchen (siehe Fig. 2).

Bezugszeichenliste

- 1
- 2 aufrechtes Mikroskop
- 3 inverses Mikroskop
- 4 Objektträger
- 5
- 6 Aufnahmehalterung/-vorrichtung
- 7
- 8 Mikroskoptisch/-bühne
- 9
- 10 biol. Objekt(e)
- 11
- 12 Objektiv
- 13 fokussierter Laserstrahl

14 Flugbahn

15

16 zweite Aufnahmehalter

17

18 Auffanggefäß

5

19

20 Klebeklatsche

21

22 Roboterarm

10

Patentansprüche

1. Verfahren zum Separieren und Sortieren von biologischen Objekten auf einem planaren Träger (4), auf dem sich die selektierten biologischen Objekte (10) zusammen mit weiterer biologischer Masse befinden, **dadurch gekennzeichnet**, daß zumindest ein in sich geschlossener streifenförmiger Teil der das selektierte biologische Objekt (10) umgebenden weiteren biologischen Masse durch einen Laserstrahl (13) entfernt wird, so daß das selektierte biologische Objekt (10) von seiner Umgebung freipräpariert ist, und daß anschließend das auf dem Träger (4) befindliche freipräparierte Objekt (10) durch einen weiteren Laser-Schuß/Laser-induzierten Transportprozeß von dem Träger (4) zu einer Auffangvorrichtung (18, 20) wegkatapultiert wird (Flugbahn 14).

2. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch

- eine Mikroskopanordnung (2) zur Beobachtung von biologischen Objekten wie Gewebeschnitten auf einem Objektträger (4)
- eine Laseranordnung zur Erzeugung eines fokussierten Laserstrahls (13) zum Freipräparieren eines oder mehrerer selektierter biologischer Objekte (10) auf dem Objektträger (4), wobei Laseranordnung und Objektträger relativ zueinander verschieblich angeordnet sind,
- und eine Auffangvorrichtung (18 bzw. 20) in Richtung des Laserstrahls hinter dem Objektträger (4) zum Auffangen der selektierten Objekte (10), die nach dem Freipräparieren derselben durch einen Laserinduzierten Transportprozeß (einen "Laser-Schuß") vom Objektträger (4) auf die Auffangvorrichtung (18 bzw. 20) wegkatapultiert werden (Flugbahn 14).

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

50

55

60

65

- Leerseite -

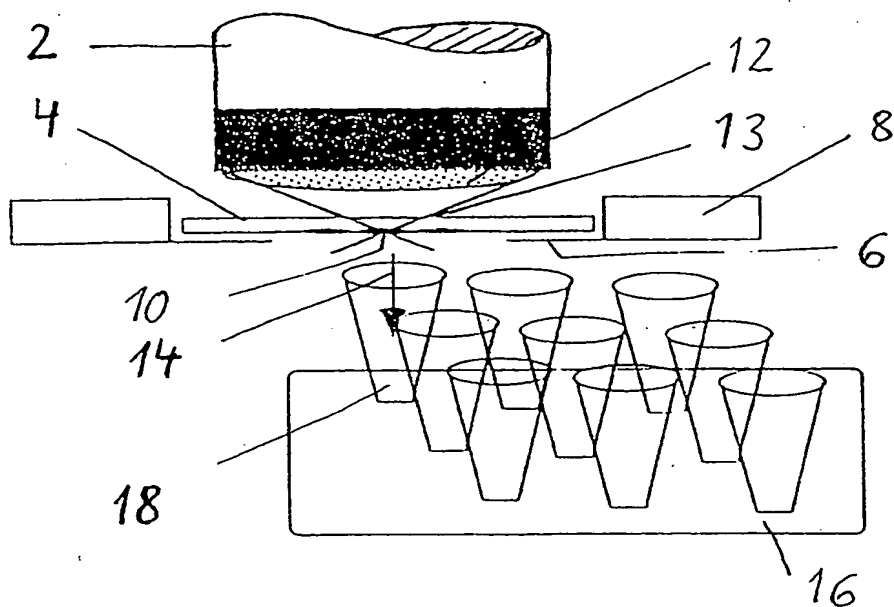


Fig. 1

Fig. 2

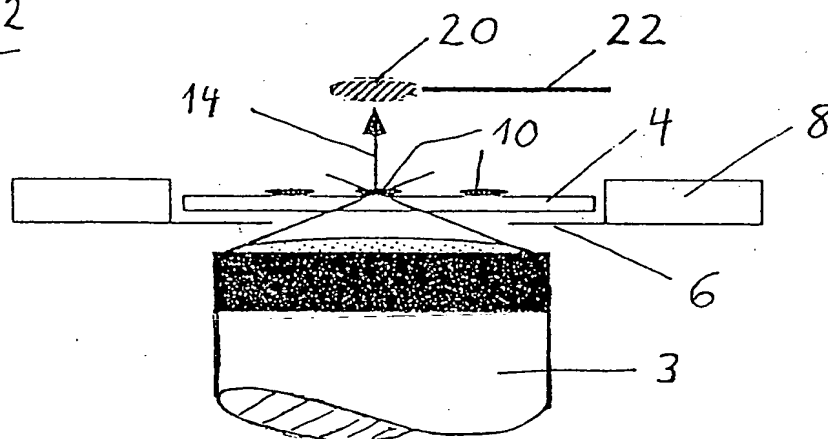


Fig. 3

